

Rec'd PCT/PTO 18 MAY 2005

PCT/JPC3/14697

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

19.11.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

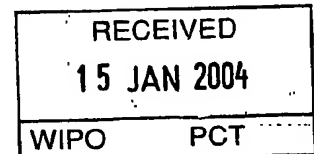
出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年11月19日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-335281

[ST. 10/C]: [JP2002-335281]

出 願 人
Applicant(s):

萩原 義秀
萩原 秀昭

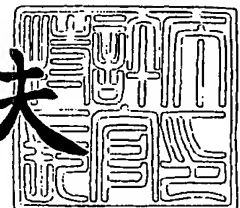


**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年12月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



出証番号 出証特2003-3107110

【書類名】 特許願

【整理番号】 200211052

【提出日】 平成14年11月19日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N
C07K

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市平井山荘 4 番 1 4 号

【氏名】 萩原 義秀

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県宝塚市平井山荘 4 番 1 4 号

【氏名】 萩原 秀昭

【特許出願人】

【識別番号】 000234074

【氏名又は名称】 萩原 義秀

【特許出願人】

【識別番号】 596106560

【氏名又は名称】 萩原 秀昭

【代理人】

【識別番号】 100060782

【弁理士】

【氏名又は名称】 小田島 平吉

【選任した代理人】

【識別番号】 100074217

【弁理士】

【氏名又は名称】 江角 洋治

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 019666

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 癌細胞増殖抑制ヒトモノクローナル抗体の取得法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒトモノクローナル抗体又はその断片をヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号 2 4 6 ～ 3 7 2 の領域を含むヒトビメンチン断片と接触させ、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号 2 4 6 ～ 3 7 2 の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することを特徴とする癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片の取得方法。

【請求項 2】 請求項 1 に記載の方法により得られるヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3】 請求項 1 に記載の方法により得られるヒトモノクローナル抗体由来のヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号 2 4 6 ～ 3 7 2 の領域と特異的に結合する断片。

【請求項 4】 ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号 2 4 6 ～ 3 7 2 の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を有効成分として含有することを特徴とする癌細胞増殖抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、たとえば、ヒトの疾患の治療、診断、予防などの医学および薬学分野や、生化学試薬、生体高分子の精製試薬などの薬理学・生化学分野などの広い分野において有用な癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体またはその断片の取得方法に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術および課題】

癌細胞は正常細胞とは質的・量的に異なった癌特異抗原あるいは癌関連抗原を有しており、ある場合には、そのような抗原をもつ癌細胞は宿主の免疫系によって排除されると考えられる。ヒトの場合、初期の研究において癌患者の血清中に

自己の癌細胞と反応する抗体の存在が確認されたことから、そのような抗体を大量に且つ安定に供給することが可能であれば、癌の治療・診断において極めて利用価値の高いものになると考えられた。しかし、癌患者の血清中には、1) 多種多様な特異性をもつ抗体が含まれていること、2) 量的に制限があること、3) 安定供給が得られないこと、などの問題点があった。

【0003】

KohlerとMilsteinによって開発されたハイブリドーマ法によるモノクローナル抗体の作製技術はこれらの問題点を解決するものであった。彼らの報告以後、ヒト癌細胞あるいはその抽出物でマウスを免疫し、ヒト癌細胞と反応する多数のマウスモノクローナル抗体がつくられ、それらが認識する抗原の同定とともに、一部の抗体は臨床応用も試みられた。

【0004】

しかしながら、そのような臨床試験の結果から明らかになった問題点は、ヒトにとって異種であるマウス由来の抗体をヒトに頻回投与した場合、HAMA反応 (Human Anti-Mouse Antibody response: ヒト抗マウス抗体反応) が誘導され、その結果、副作用ならびに治療効果の減弱を引き起こすことであった。そこで、より安全性の高い同種由来の抗癌抗体、すなわちヒト抗癌モノクローナル抗体の出現が要望された。

【0005】

このような状況下に、本発明者らは、特公平1-59878号公報、特公平7-121221号公報、特公平7-119240号公報、特許第2599258号公報、特許第2509191号公報、特公平8-29078号公報、特公平7-98000号公報、特許第2721817号公報、特許第2830976号公報、特開昭62-70400号公報、特開平06-141884号公報、特開平09-100300号公報に詳しく開示されているごとく、癌患者リンパ球とヒトB細胞リンパ芽球との細胞融合により種々のヒト-ヒトハイブリドーマを創製し、癌細胞と結合性を有するヒトモノクローナル抗体を多数取得した。本発明者らは、それら抗体に関しさらに研究を行なったところ、ヒトモノクローナル抗体の癌細胞結合活性と抗癌効果 (細胞増殖抑制効果) との間には明確な相関が存在

しないこと、すなわち、癌と結合する抗体のすべてが抗癌効果を示すものでは必ずしもないことが判明した。癌細胞に結合する抗体の特異性は非常に多様であるので、それらすべてにおいて抗癌効果を調べることは實際上不可能である。

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の主たる目的は、癌細胞と結合する多数のヒトモノクローナル抗体の中から抗癌効果を示す抗体を選別・取得することができる簡便な方法を提供することである。

【0 0 0 7】

【課題を解決するための手段】

そこで、本発明者らは、上記の如き課題を解決すべく、以下のような研究を行った。

【0 0 0 8】

本発明者らは、先に、子宮癌患者リンパ球とヒトB細胞リンパ芽球との細胞融合により、ヒト癌細胞に高い反応性を有するヒトモノクローナル抗体を産生するヒト-ヒトハイブリドーマ細胞株CLNH11を樹立した。そして、CLNH11が産生するモノクローナル抗体CLN-IgGが子宮癌のみならず脳腫瘍、肺癌、胃癌、大腸癌などの多くの種類の癌と結合し、さらには癌細胞の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、CLN-IgGが認識する抗原は細胞骨格蛋白質の一種であるヒトビメンチンであることを明らかにした(Hagiwara et al. Human Antibodies 10, 77-82 (2001))。また、ヒトビメンチンの各種断片を作製し、それぞれの断片とCLN-IgGの結合性を調べ、CLN-IgGによって認識される抗原エピトープ領域を同定したところ、ヒトビメンチンのロッドC2ドメイン上のアミノ酸残基番号289～367からなる領域にエピトープが存在することが判明した(特開2002-51785号公報)。

【0 0 0 9】

癌細胞増殖抑制効果を期待して抗体を作製する場合、これまでは、細胞増殖関連蛋白質(たとえば、細胞膜上の細胞増殖因子受容体や細胞増殖因子など)や特

に癌細胞で過剰に発現している細胞表面蛋白質などを標的抗原として用いるのが通例であった。したがって、細胞骨格蛋白質であるヒトビメンチンが癌抗原として機能し、なおかつ、抗体による細胞増殖抑制効果の標的となりうることはこれまで全く知られておらず、ましてや、ヒトビメンチンを標的とした抗癌ヒトモノクローナル抗体は皆無であった。

【0 0 1 0】

そこで、本発明者らは、ヒト癌細胞と反応する種々のヒトモノクローナル抗体の特異性と抗腫瘍効果との関連性を調べた。その結果、今回、ヒトビメンチンの特定のエピトープに結合性を有する抗体は癌細胞増殖抑制活性を持ち、他方、結合性を有しない抗体は癌細胞増殖抑制活性を実質的に示さないことを究明し、ヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号 2 4 6 ~ 3 7 2 の領域を含むヒトビメンチン断片と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することによって、癌細胞の破壊または増殖抑制効果を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択・所得できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0 0 1 1】

【発明の実施の形態】

かくして、本発明によれば、ヒトモノクローナル抗体又はその断片をヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号 2 4 6 ~ 3 7 2 の領域を含むヒトビメンチン断片と接触させ、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号 2 4 6 ~ 3 7 2 の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することを特徴とする癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片の取得方法が提供される。

【0 0 1 2】

以下、本発明によって提供される方法についてさらに詳細に説明する。

【0 0 1 3】

【発明の実施の形態】

ヒトビメンチンは、細胞の構造を維持する働きをする細胞骨格蛋白質のうち、中間径フィラメントに分類される蛋白質（アミノ酸残基数 4 6 6、分子量 5 3、

651)である。ヒトビメンチンはN末端側からhead、coil1 (C1)、coil2 (C2)、tailの4つのドメイン構造を有し、特にC1およびC2は螺旋状の構造を有している。

【0014】

このうち、C2ドメイン上にヒトモノクローナル抗体CLN-IgGによって認識されるエピトープが存在する。そこで、本発明者らは、このエピトープ領域をさらに絞り込むために、種々のC2断片をコードするDNAを大腸菌発現ベクターに組み込み、GST (グルタチオンSトランスフェラーゼ) との融合蛋白質として発現させ精製した後、ウェスタンブロッティングおよびELISA法を用いて、それら断片とモノクローナル抗体との結合性を調べた。その結果、2種類のモノクローナル抗体がビメンチンのアミノ酸残基289～367の断片と結合することが明らかとなった (特開2002-51785号公報)。

【0015】

つぎに、各種ヒトモノクローナル抗体の癌細胞増殖抑制活性を調べるために、ヌードマウスを用いてin vivo試験を行った。まず、ヒトモノクローナル抗体と子宮頸部癌細胞株ME-180を混合し、ヌードマウスの皮下に移植した後、腫瘍体積を経時的に測定し、細胞増殖抑制効果を評価した。その結果、上述したようなヒトビメンチンエピトープと結合性を示した抗体のみに強い細胞増殖抑制効果が認められた。

【0016】

これらのことより、ヒトモノクローナル抗体において、ヒトビメンチンのC2ドメイン上のエピトープ領域に対する結合性と癌細胞増殖抑制効果との間には密接な関連があることが示された。したがって、該ヒトビメンチンエピトープを用いることによって、癌細胞増殖抑制効果を示すヒトモノクローナル抗体を容易に選択・取得することが可能となる。

【0017】

ヒトモノクローナル抗体CLN-IgGによって認識されるヒトビメンチンのC2ドメイン上のエピトープ領域について、本発明者らは、先に、ヒトビメンチンのC2ドメインの各種ペプチド断片を作製し、それぞれの断片とCLN-Ig

Gとの反応性から、CLN-I g Gによって認識される抗原エピトープ領域を同定し、その領域のアミノ酸配列を解析し、その領域がヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号289～367の部分に相当することを明らかにした（特開2002-51785号公報）。本発明者らは、ヒトモノクローナル抗体CLN-I g Gによって認識されるヒトビメンチンのC2ドメイン上のエピトープ領域について、その三次元構造も含めてさらに検討を重ねた結果、CLN-I g Gによって認識される抗原エピトープ領域は、ヒトビメンチンのアミノ酸配列残基289～367の部分よりも、さらに広い領域を認識している可能性があることがわかり、その領域のアミノ酸配列を解析し、下記のアミノ酸配列

Gln	Ala	Gln	Ile	Gln	Glu	Gln	His	Val	Gln	Ile	Asp	Val	Asp	Val	Ser	246	250	260
Lys	Pro	Asp	Leu	Thr	Ala	Ala	Leu	Arg	Asp	Val	Arg	Gln	Gln	Tyr	Glu	270		
Ser	Val	Ala	Ala	Lys	Asn	Leu	Gln	Glu	Ala	Glu	Glu	Trp	Tyr	Lys	Ser	280	290	
Lys	Phe	Ala	Asp	Leu	Ser	Glu	Ala	Ala	Asn	Arg	Asn	Asn	Asp	Ala	Leu	300		
Arg	Gln	Ala	Lys	Gln	Glu	Ser	Thr	Glu	Tyr	Arg	Arg	Gln	Val	Gln	Ser	310	320	
Leu	Thr	Cys	Glu	Val	Asp	Ala	Leu	Lys	Gly	Thr	Asn	Glu	Ser	Leu	Glu	330	340	
Arg	Gln	Met	Arg	Glu	Met	Glu	Glu	Asn	Phe	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Asn	350		
Tyr	Gln	Asp	Thr	Ile	Gly	Arg	Leu	Gln	Asp	Glu	Ile	Gln	Asn	Met		360	370	372

で示されるヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号246～372の部分を決定した（配列表の配列番号6）。

【0018】

上記のアミノ酸配列残基 246～372 の領域を含むヒトビメンチン断片（以下「ヒトビメンチンエピトープ断片」ということがある）は種々の方法で製造することが可能である。たとえば、ヒトビメンチンエピトープ断片は、それ自体既知の固相または液相合成法によって化学的に合成することができる。また、ヒトビメンチンエピトープ断片のアミノ酸配列からそれをコードする DNA を合成し、それを細菌、動物細胞、植物細胞などの宿主とそれに対する発現ベクターからなるベクター-宿主細胞系に適用して遺伝子工学的に製造することも可能である。この場合、種々の機能を有する融合蛋白質の形態で発現させることもできる。

【0019】

ヒトビメンチンエピトープ断片は、CLN-IgG と結合するものであれば、その大きさには特に制限はなく、また、CLN-IgG との結合性が損なわれないう範囲で、アミノ酸配列の一部が欠失、置換および／又は追加されているものも包含される。

【0020】

他方、本発明の方法において、ヒトビメンチンとしては、ヒトビメンチンを発現しているヒト細胞、例えばヒト膠芽腫細胞株 U-251 MG そのものを使用することができ、或いは該細胞から通常の蛋白質精製法に従い、例えばアフィニティクロマトグラフィー等の手段により分離される粗製の又は精製されたヒトビメンチンを使用することもできる。

【0021】

ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープ断片を用いて、癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片（以下、便宜上「ヒトモノクローナル抗体」ということがある）を選別・取得する方法としては、例えば、ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープ断片を適当な固体担体（例えば、マイクロプレート、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、ガラスビーズ、樹脂、センサーチップ等）上に付着固定し、被検ヒトモノクローナル抗体又はその断片を含む液体と接触させ、担体上のヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープ断片と結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を、酵素抗体法を利用するウェスタンブロットティング法、ELISA 法、ドットブロットティング法；表面プラズ

モン共鳴を利用する測定法等によって検出することからなる方法が挙げられる。

【0022】

かくして、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択・取得することができる。

【0023】

なお、上記の被検ヒトモノクローナル抗体としては、精製されたヒトモノクローナル抗体のみならず、ヒトモノクローナル抗体を産生している細胞そのものを使用することもできる。

【0024】

以上に述べた本発明の方法により取得されるヒトモノクローナル抗体又はその断片は、その抗体の由来に応じて各種の癌細胞の増殖を抑制する効果を有しており、癌細胞増殖抑制剤の有効成分として、例えば、子宮癌、肺癌、胃癌、大腸癌、脳腫瘍、肝癌、乳癌、前立腺癌などの癌疾患の処置のために使用することが期待される。

【0025】

本発明により取得されるヒトモノクローナル抗体又はその断片を癌細胞増殖抑制剤として臨床的に使用する場合、該ヒトモノクローナル抗体又はその断片は、それ自体既知の方法で、例えば適当な賦形剤と共に凍結乾燥粉末の形態に製剤化することができ、得られる製剤は注射用蒸留水で復元した後、非経口的に例えば静脈内、腫瘍内に投与することができる。

【0026】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれらによって何ら制限されるものではない。

実施例1：ヒトビメンチンに結合するヒトモノクローナル抗体のウェスタンブロッティング法による選択

ヒト膠芽腫細胞株U-251 MGを62.5mMトリス（pH6.8）、2% SDS、5% 2-メルカプトエタノール、4M尿素を含む溶液中で超音波

破碎し、細胞 5×10^4 個に相当する破碎液を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にかけた。

【0027】

電気泳動後、セミドライ型のブロッティング装置を用いて 48 mM トリス、39 mM グリシン、0.037% SDS、10% メタノール中で Hybond ECL 膜 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) に蛋白質を転写した。

【0028】

つぎに、転写後の膜をブロッキング溶液 (5% スキムミルク含有 PBS-T (0.3% Tween 20 を含有するリン酸緩衝生理食塩水)) に 37℃ で 1 時間浸した後、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ の一次抗体 (1% スキムミルク含有 PBS-T に溶解した CLN-IgG、TOH/G2-IgG、IM9-IgG 又は HT2-IgM) に、37℃ で 30 分間浸した。

【0029】

さらに、膜を PBS-T で 3 回洗った後、二次抗体 (1% スキムミルク含有 PBS-T で溶解したペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒト IgG 抗体又はペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒト IgM 抗体 (いずれも BIOSORCE 社製、1 万倍希釈)) に 37℃ で 30 分間浸した。PBS-T で 3 回洗った後、ECL detection reagent (アマシャムファルマシアバイオテク社製) を添加し、1 分間静置した (ECL detection reagent は、膜上に固定された蛋白質の中から、ペルオキシダーゼ標識抗体を用いて、目的の抗原を化学発光によって検出する高感度システムである)。

【0030】

最後に、膜から Detection reagent を除去し、膜を OHP シートにはさみ X 線フィルムに 1 分間露光した後、フィルムを現像した。

【0031】

その結果、図 1 に示すとおり、被検ヒトモノクローナル抗体 4 種のうち、CLN-IgG と HT2-IgM の 2 種がヒトビメンチンを認識していることが判明した (図 1 で矢印はビメンチンの位置を表す)。

実施例 2: ヒトビメンチン C2 断片-GST 融合蛋白質の作製

ヒトビメンチンのアミノ酸配列をもとに配列表に示す配列番号 1, 2, 3 の 3' 側の DNA プライマーおよび配列番号 4, 5 の 5' 側の DNA プライマーを合成し、これらのプライマーを種々組み合わせて、ヒトビメンチン C2 ドメインを含むプラスミドを鋳型に PCR を行い、C2 ドメインの種々部分配列を増幅した。得られた断片を *EcoRI* および *NotI* で消化した後、DNA ライゲーションキット・バージョン 2 (宝酒造社製) を用いて、*EcoRI* および *NotI* で消化した GST 融合蛋白質発現ベクター pGEX-4T-1 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) に連結した。さらに、大腸菌 BL21 を得られたプラスミドで形質転換し、アンピシリン耐性株を選択し、それらからアルカリ法でプラスミドを調製した。得られたプラスミドを *EcoRI* および *NotI* で消化した後、アガロース電気泳動にかけ、ヒトビメンチン C2 の断片が挿入されているクローンを確認し選択した。

【0032】

上記で得られた各組換えプラスミドを有する大腸菌クローンを 2 mL の LB 培地 (バクトトリプトン 10 g/L、バクトイーストエキストラクト 5 g/L、塩化ナトリウム 10 g/L) に植え、25℃で一晩培養した。この培養液を再び 20 mL の LB 培地に植え、25℃で 3.5 時間培養した後、1 M の IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) を 2 μ L 加えてさらに 2 時間培養した。5,000 rpm で 5 分間遠心して集菌し、上清を捨て、沈殿に 1 mL の PBS (フォスフェートバッファードセーライン、生理食塩水 (pH 7.2)) を加えた。菌体を懸濁した溶液を超音波処理し、20% Triton X-100 を 1 mL 加えた後、4℃で 1 時間振盪し、グルタチオンセファロース 4B (ファルマシア社製) によるアフィニティークロマトグラフィーで精製し、ヒトビメンチン C2 断片-GST 融合蛋白質を得た。

実施例 3: ヒトビメンチン C2 断片に結合するヒトモノクローナル抗体のウェスタンブロットティング法による選択

実施例 1 で得られた各融合蛋白質を 200 ng/レーンの濃度に調整し、SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルからセミドライ・ブロットティング法により

Hybond-ECL膜（アマシャムファルマシアバイオテク社製）に蛋白質を転写した。転写後の膜をブロッキング溶液（5% スkimミルク含有 PBS-T）に37℃で1時間浸した後、一次抗体（1% スkimミルク含有 PBS-Tで溶解した CLN-IgG または HT2-IgM（それぞれ10 μ g/mL））に37℃で30分間浸した。PBS-Tで3回洗った後、二次抗体溶液（1% スkimミルク含有 PBS-Tで溶解したペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒト IgG 抗体又はペルオキシダーゼ標識アフィニティ精製ヤギ抗ヒト IgM 抗体（いずれも BIOSORCE 社製、25,000倍希釈））に37℃で30分間浸した。PBS-Tで3回洗った後、ECL detection reagent（アマシャムファルマシアバイオテク社製）を添加し1分間静置した。さらに、膜から Detection reagent を除去し、膜を OHP シートにはさみ X 線フィルムに1分間露光した後、フィルムを現像した。その結果を図2に示す。なお、図2Bにおいては、融合蛋白質の他に参照として、ウシ血清アルブミンを200 ng/レーンの濃度で、また、膠芽腫細胞株 U-251MG の細胞抽出液（8M 尿素、2% SDS、4% DTT、0.125M Tris-HCl pH 6.8 で細胞を破碎した溶液）を10 μ g 蛋白/レーンの濃度で電気泳動にかけた。

【0033】

その結果、CLN-IgG（図2A）と HT2-IgM 抗体（図2B）のいずれもヒトビメンチン（アミノ酸残基番号246～397）と反応すること、特にヒトビメンチン C2 エピトープ断片（アミノ酸残基番号246～372）と強く反応することが判明した。このことから、CLN-IgG および HT2-IgM はヒトビメンチンのアミノ酸残基番号246～372 からなる領域を認識することが明らかとなった。

実施例4：ヌードマウス移植癌に対する細胞増殖抑制効果

ヒト子宮頸部癌 ME-180 細胞株（ATCC HTB33） 5×10^6 個をヒトモノクローナル抗体（CLN-IgG、TOH/G2-IgG 又は IM9-IgG）170 μ g と混合した後、ヌードマウス（日本クレア、BALB/c AJC1-nu nu/nu 6週齢雌、1群5匹）の皮下へ移植し、経時的に

腫瘍体積を測定した。腫瘍体積は (長径) \times (短径)² \times 1/2 の近似式により求めた。

【0034】

その結果、ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープと結合性を有しない IM9-IgG および TOH/G2-IgG では癌細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかったが、ヒトビメンチン又はヒトビメンチンエピトープと結合性を有している CLN-IgG は強い癌細胞増殖抑制効果を示した (図3)。

実施例5: *in vitro*における癌細胞増殖抑制試験

10%ウシ胎児血清 (FBS) を含有する DF 培地に 5×10^4 /mL の濃度で懸濁したヒト膠芽種細胞株 U251MG を 100 μ L ずつ 96 ウェルマイクロプレート (ヌンク社製) にまき、そこへ HT2-IgM 又は IM9-IgG を最終濃度が 50 μ g/mL または 100 μ g/mL になるように添加した。さらに、炭酸ガス濃度 5%、37℃ の条件で 2 日間培養した後、Cell proliferation ELISA 試薬 (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて S 期の細胞による BrdU の取り込みを測定した。具体的には、ウェルあたり 10 μ L の BrdU (100 μ M) を加え、2 時間培養し、細胞の固定と DNA の変性を行った後、ペルオキシダーゼ標識抗 BrdU 抗体と 90 分間反応させ、最後に酵素基質テトラメチルベンジジン (TMB) を添加し 370 nm の吸光度を測定した。抗体を添加しない細胞のみの対照群と比較し、細胞増殖抑制活性を求めた。

【0035】

結果は下表 (表1) に示すとおりであり、HT2-IgM では癌細胞増殖抑制効果が認められたが、IM9-IgG では認められなかった。すなわち、ヒトビメンチンエピトープ断片との結合性を有している HT2-IgM 抗体は増殖抑制活性を示し、他方、結合性を有していない IM9-IgG 抗体は増殖抑制効果を示さなかったことから、該エピトープ断片に対する反応性の有無を調べることで、細胞増殖抑制効果をもつ抗体を選別・取得することが可能となる。

【0036】

【表 1】

表 1: ヒトモノクローナル抗体による in vitro 癌細胞増殖抑制効果

ヒトモノクローナル抗体	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	細胞増殖抑制活性 (%) ^a
HT2-IgM	50	28.7
	100	38.4
IM9-IgG	50	-1.4
	100	-20.0

a. ヒトモノクローナル抗体を添加しなかった細胞のみの群を対照としたときの増殖抑制活性。

【0037】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Yoshihide HAGIWARA

<110>Hideaki HAGIWARA

<120>癌細胞増殖抑制ヒトモノクローナル抗体のスクリーニング法

<130>200211052

<160>4

<210>1

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400>1

TAGCGGCCGCATTCTGAATCTCAT

<210>2

<211>26

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400>2

GCGGCCGCATCCTGCAGGCGGCCAAT

<210>3

<211>25

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400>3

TAGCGGCCGCCATATTCTGAATCTC

<210>4

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400>4

CCAGAATTCCAGGCTCAGATTCAG

<210>5

<211>24

<212>DNA

<213>Artificial Sequence

<220>

<223>ヒトビメンチンの配列を参考にして合成

<400>5

CGGGAATTCTGAATGGTACAAATCC

<210>6

<211>127

<212>PRT

<213>human

<220>

<223>

<400>6

Gln Ala Gln Ile Gln Glu Gln His Val Gln Ile Asp Val Asp Val Ser

1

10

Lys Pro Asp Leu Thr Ala Ala Leu Arg Asp Val Arg Gln Gln Tyr Glu

20

30

Ser Val Ala Ala Lys Asn Leu Gln Glu Ala Glu Glu Trp Tyr Lys Ser

40

Lys Phe Ala Asp Leu Ser Glu Ala Ala Asn Arg Asn Asn Asp Ala Leu

50

60

Arg Gln Ala Lys Gln Glu Ser Thr Glu Tyr Arg Arg Gln Val Gln Ser

70

80

Leu Thr Cys Glu Val Asp Ala Leu Lys Gly Thr Asn Glu Ser Leu Glu

90

Arg Gln Met Arg Glu Met Glu Glu Asn Phe Ala Val Glu Ala Ala Asn

100

110

Tyr Gln Asp Thr Ile Gly Arg Leu Gln Asp Glu Ile Gln Asn Met

120

【図面の簡単な説明】

【図 1】

ウェスタンブロッティングでみたヒトモノクローナル抗体とヒト膠芽種細胞株 U-251MG のビメンチンとの結合性。

【符号の説明】

- 1 分子量マーカー
- 2 CLN-IgG
- 3 TOH/G2-IgG
- 4 IM9-IgG
- 5 HT2-IgM

図中、右側に示した矢印はヒトビメンチンの位置を表す。

【図 2】

ウェスタンブロッティングでみたヒトモノクローナル抗体とビメンチン断片-GST 融合蛋白質との結合性。

【符号の説明】

A. CLN-IgG を用いたウェスタンブロッティング

- 1 分子量マーカー
- 2 GST
- 3 ヒトビメンチン C2 ドメイン (アミノ酸残基番号 246 ~ 397) - GST 融合蛋白質
- 4 ヒトビメンチン C2 断片 (アミノ酸残基番号 246 ~ 367) - GST 融合蛋白質
- 5 ヒトビメンチン C2 断片 (アミノ酸残基番号 246 ~ 372) - GST 融合蛋白質
- 6 ヒトビメンチン C2 断片 (アミノ酸残基番号 289 ~ 367) - GST 融合蛋白質
- 7 ヒトビメンチン C2 断片 (アミノ酸残基番号 246 ~ 371) - GST 融合蛋白質
- 8 ヒトビメンチン C2 断片 (アミノ酸残基番号 246 ~ 372) - GST 融合蛋白質

- 9 ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号289～371) -GST融合蛋白質
- 10 ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号289～372) -GST融合蛋白質
- 11 分子量マーカー

B. HT-2 IgMを用いたウェスタンブロッティング

レーン1～6はCBB染色、レーン7～12はウェスタンブロッティング

- 1 分子量マーカー
- 2 ヒトビメンチンC1ドメイン (アミノ酸残基番号96～245) -GST融合蛋白質
- 3 ヒトビメンチンC2ドメイン (アミノ酸残基番号246～397) -GST融合蛋白質
- 4 ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246～372) -GST融合蛋白質
- 5 BSA (ウシ血清アルブミン)
- 6 ヒト膠芽腫U-251 MG細胞抽出液
- 7 分子量マーカー
- 8 ヒトビメンチンC1ドメイン (アミノ酸残基番号96～245) -GST融合蛋白質
- 9 ヒトビメンチンC2ドメイン (アミノ酸残基番号246～397) -GST融合蛋白質
- 10 ヒトビメンチンC2断片 (アミノ酸残基番号246～372) -GST融合蛋白質
- 11 BSA (ウシ血清アルブミン)
- 12 ヒト膠芽腫U-251 MG細胞抽出液

【図3】

ヌードマウス移植癌 (ヒト子宮頸部癌細胞株ME-180) に対する各種ヒトモノクローナル抗体の細胞増殖抑制効果

【符号の説明】

○：PBS

■：TOH/G2-IgG

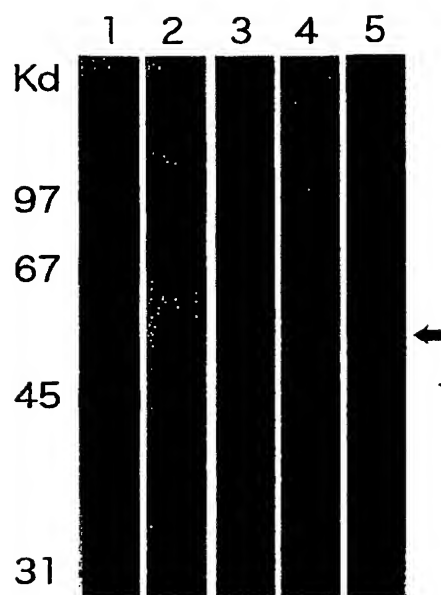
●：IM9-IgG

▲：CLN-IgG

【書類名】

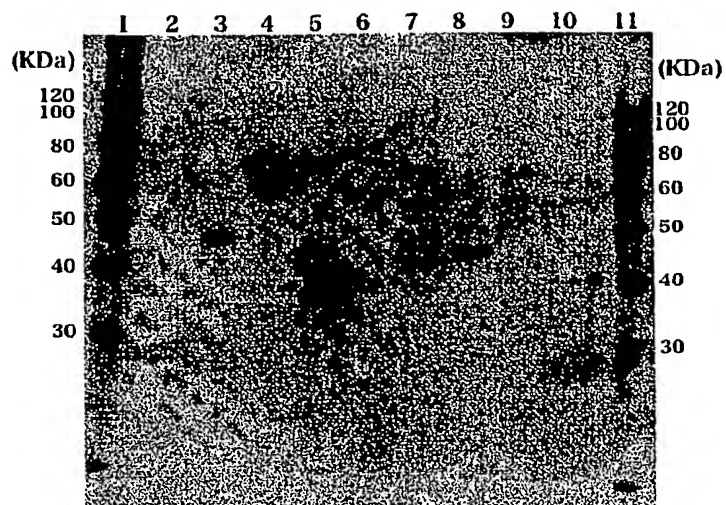
図面

【図 1】

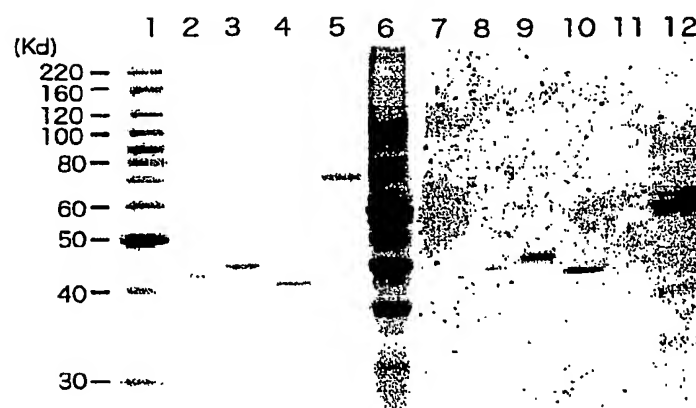


【図 2】

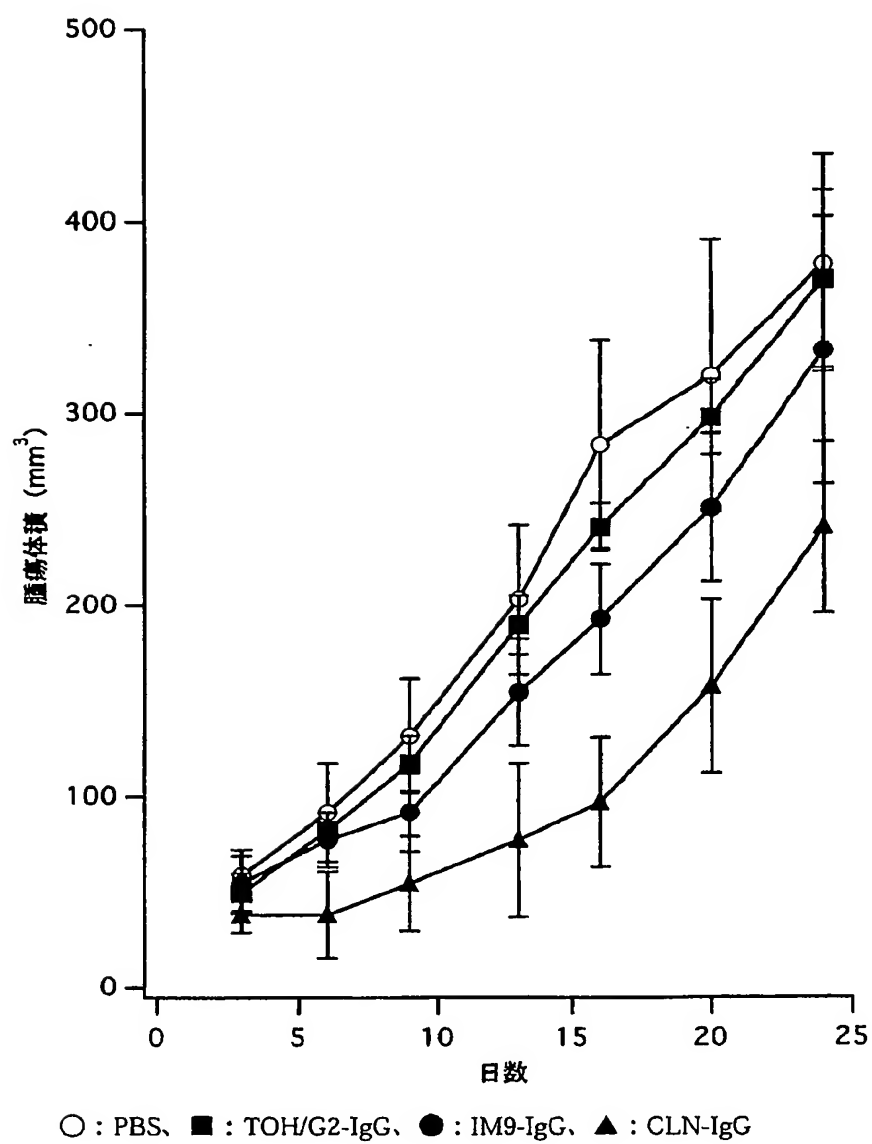
A



B



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体を選別するための簡便な方法を提供すること。

【解決手段】 ヒトモノクローナル抗体又はその断片をヒトビメンチン又は少なくともヒトビメンチンのアミノ酸配列残基番号246～372の領域を含むヒトビメンチン断片と接触させ、ヒトビメンチンのアミノ酸配列のアミノ酸残基番号246～372の領域と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体又はその断片を選択することを特徴とする癌細胞増殖抑制活性を有するヒトモノクローナル抗体又はその断片の取得方法。

【選択図】 なし

特願 2002-335281

出 願 人 履 歷 情 報

識別番号

[000234074]

1. 変更年月日

1990年 8月30日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県宝塚市平井山荘4番14号

氏 名

萩原 義秀

特願 2002-335281

出願人履歴情報

識別番号

[596106560]

1. 変更年月日

1996年 7月 3日

[変更理由]

新規登録

住 所

兵庫県宝塚市平井山荘4番14号

氏 名

萩原 秀昭